

POWERED BY Dialog

**DNA contg. upstream regulatory region from malate synthase gene of coryneform bacteria - used for regulated synthesis of protein in coryneform(s), regardless of nutrient medium compsn..**

**Patent Assignee:** FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH

**Inventors:** EIKMANNS B; REINSCHEID D; SAHM H

#### Patent Family (8 patents, 21 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
DE 4440118	C1	19951109	DE 4440118	A	19941111	199549	B
WO 1996015246	A1	19960523	WO 1995DE1555	A	19951107	199626	E
ZA 199509598	A	19960731	ZA 19959598	A	19951113	199635	E
EP 791062	A1	19970827	EP 1995936429	A	19951107	199739	E
			WO 1995DE1555	A	19951107		
KR 1997707269	A	19971201	WO 1995DE1555	A	19951107	199847	E
			KR 1997703175	A	19970512		
JP 10512742	W	19981208	WO 1995DE1555	A	19951107	199908	E
			JP 1996515635	A	19951107		
US 5965391	A	19991012	WO 1995DE1555	A	19951107	199949	E
			US 1997836943	A	19970508		
CN 1174574	A	19980225	CN 1995197304	A	19951107	200171	E

**Priority Application Number (Number Kind Date): DE 4440118 A 19941111**

#### Patent Details

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
DE 4440118	C1	DE	12	3	
WO 1996015246	A1	DE	34	4	
National Designated States,Original	CN JP KR US				
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE				
ZA 199509598	A	EN	25	0	
EP 791062	A1	DE		0	PCT Application WO 1995DE1555  Based on OPI

				patent WO 1996015246
Regional Designated States,Original	DE FR GB IE IT NL SE			
KR 1997707269	A	KO		PCT Application WO 1995DE1555  Based on OPI patent WO 1996015246
JP 10512742	W	JA	22	PCT Application WO 1995DE1555  Based on OPI patent WO 1996015246
US 5965391	A	EN		PCT Application WO 1995DE1555  Based on OPI patent WO 1996015246

**Alerting Abstract:** DE C1

New DNA fragment (I), connected upstream to the malate synthase (aceB) gene of a coryneform bacterium and isolated from it, is able to regulate the expression of a protein-encoding structural gene placed downstream of it, after incorporation into a vector and transfer into a coryneform bacterium. Also new are: (1) vectors contg. (I); and (2) recombinant coryneform cells contg. (I) in replicable form.

**USE** - Transformed bacteria, contg. a structural gene under control of (I), are used for regulating protein synthesis.

**ADVANTAGE** - Expression of protein is induced with inexpensive inducers, esp. acetate, and induction occurs even when the culture medium contains carbon sources other than acetate.

**International Classification (Main):** C12N, C12N-001/21, C12N-015/09, C12N-015/31, C12N-015/77, C12P-021/00 **(Additional/Secondary):** C07H-021/04, C07K, C07K-014/34, C07K-002/00, C12N-001/20, C12N-015/11, C12R-001/15

**US Classification, Issued:** 435069100, 435252320, 435320100, 435471000, 435476000, 435487000, 536024100

**Original Publication Data by Authority****China**

Publication Number: CN 1174574 A (Update 200171 E)

Publication Date: 19980225

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH; DE (KERJ)

Language: ZH

Application: CN 1995197304 A 19951107 (Local application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Original IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

Current IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

### Germany

Publication Number: DE 4440118 C1 (Update 199549 B)

Publication Date: 19951109

\*\*Die Genexpression in coryneformen Bakterien regulierende DNA \*\*

Assignee: Forschungszentrum Juelich GmbH, 52428 Juelich, DE (KERJ)

Inventor: Reinscheid, Dieter, Dr., 59872 Meschede, DE Eikmanns, Berndhard, Dr., 52428 Juelich, DE SAHM H

Language: DE (12 pages, 3 drawings)

Application: DE 4440118 A 19941111 (Local application)

Original IPC: C12N-15/77(A) C07K-2/00(B) C07K-14/34(B) C12N-1/21(B) C12N-15/31(B)

Current IPC: C12N-15/77(A) C07K-2/00(B) C07K-14/34(B) C12N-1/21(B) C12N-15/31(B)

Claim: \* 1. Ein dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltes und von diesem isoliertes DNA-Fragment, das die Expression eines beliebigen, für ein Protein kodierenden, dem DNA-Fragment nachgeschaltete n Strukturgens nach Einbau in einen Vektor und Transformation in ein coryneformes Bakterium reguliert.

### European Patent Office

Publication Number: EP 791062 A1 (Update 199739 E)

Publication Date: 19970827

\*\*DIE GENEXPRESSION IN CORYNEFORMEN BAKTERIEN REGULIERENDE DNA WHICH REGULATES GENE EXPRESSION IN CORYNE-FORM BACTERIA AND REGULANT L'EXPRESSION GENIQUE DANS DES BACTERIES DU GENRE CORYNEBACTERIUM\*\*

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JULICH GMBH, Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Juelich, DE (KERJ)

Inventor: REINSCHEID, Dieter, 2267 West 7th Avenue, Vancouver, British Columbia V6K 1Y3, CA EIKMANNS, Bernhard, Pfarrer-Engels-Strasse 7e, D-52428 Juelich, DE SAHM, Hermann, Wendelinusstrasse 71, D-52428 Juelich, DE

Language: DE (0 drawings)

Application: EP 1995936429 A 19951107 (Local application) WO 1995DE1555 A 19951107 (PCT Application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Related Publication: WO 1996015246 A (Based on OPI patent )

Designated States: (Regional Original) DE FR GB IE IT NL SE

Original IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

Current IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

Original Abstract: The invention concerns a DNA fragment located in front of the malate synthase gene of a coryne-form bacterium and isolated from the latter. Any structural gene which codes for a protein can be inserted after this DNA fragment. After transformation of such a construct into a coryne-form bacterium, expression of the structural gene inserted after the DNA fragment is regulated. The invention also concerns a process for synthesising any protein by culturing a transformed coryne-form bacterium. A bacterium of this type contains in replicable form a DNA fragment isolated from the malate synthase gene of a coryne-form bacterium, and after which the structural gene which codes for the protein to be synthesised is inserted. Since expression of the structural gene which codes for the protein to be synthesised is regulated by the DNA located in front of it, the structural gene is expressed and the desired

protein synthesised as soon as a suitable inducing agent is added to the medium.

Claim: New DNA fragment (I), connected upstream to the malate synthase (aceB) gene of a coryneform bacterium and isolated from it, is able to regulate the expression of a protein-encoding structural gene placed downstream of it, after incorporation into a vector and transfer into a coryneform bacterium. Also new are: (1) vectors contg. (I); and (2) recombinant coryneform cells contg. (I) in replicable form.

### Japan

Publication Number: JP 10512742 W (Update 199908 E)

Publication Date: 19981208

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH (KERJ)

Inventor: REINSCHEID D EIKMANNS B SAHM H

Language: JA (22 pages)

Application: WO 1995DE1555 A 19951107 (PCT Application) JP 1996515635 A 19951107 (Local application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Related Publication: WO 1996015246 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12N-15/09(A) C12N-1/21(B) C12P-21/00(B) C12N-1/21(C) C12R-1:15(C) C12P-21/00(D) C12R-1:15(D)

Current IPC: C12N-15/09(A) C12N-1/21(B) C12P-21/00(B) C12N-1/21(C) C12R-1:15(C) C12P-21/00(D) C12R-1:15(D)

### Republic of Korea

Publication Number: KR 1997707269 A (Update 199847 E)

Publication Date: 19971201

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH (KERJ)

Language: KO

Application: WO 1995DE1555 A 19951107 (PCT Application) KR 1997703175 A 19970512 (Local application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Related Publication: WO 1996015246 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12N-1/21(A) C12N-15/31(B)

Current IPC: C12N-1/21(A) C12N-15/31(B)

### United States

Publication Number: US 5965391 A (Update 199949 E)

Publication Date: 19991012

\*\*DNA which regulates gene expression in coryneform bacteria.\*\*

Assignee: Forschungszentrum Julich GmbH, Julich, DE (KERJ)

Inventor: Eikmanns, Bernhard, Julich, DE Sahm, Hermann, Julich, DE Reinscheid, Dieter, Braunschweig, DE

Agent: Dubno; Herberty

Language: EN

Application: WO 1995DE1555 A 19951107 (PCT Application) US 1997836943 A 19970508 (Local application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Related Publication: WO 1996015246 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12P-21/00(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12N-15/77(B)

Current IPC: C12P-21/00(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12N-15/77(B)

Original US Class (main): 43569.1

Original US Class (secondary): 435252.32 435320.1 435471 435476 435487 53624.1

Original Abstract: The invention concerns a DNA fragment located in front of the malate synthase gene

of a coryne-form bacterium and isolated from the latter. Any structural gene which codes for a protein can be inserted after this DNA fragment. After transformation of such a construct into a coryne-form bacterium, expression of the structural gene inserted after the DNA fragment is regulated. The invention also concerns a process for synthesizing any protein by culturing a transformed coryne-form bacterium. A bacterium of this type contains in replicable form a DNA fragment isolated from the malate synthase gene of a coryne-form bacterium, and after which the structural gene which codes for the protein to be synthesized is inserted. Since expression of the structural gene which codes for the protein to be synthesized is regulated by the DNA located in front of it, the structural gene is expressed and the desired protein synthesized as soon as a suitable inducing agent is added to the medium.

Claim: 1. An isolated recombinant polynucleotide comprising the nucleic acid sequence as given in SEQ ID NO: 3.

## WIPO

Publication Number: WO 1996015246 A1 (Update 199626 E)

Publication Date: 19960523

**\*\*DNA WHICH REGULATES GENE EXPRESSION IN CORYNE-FORM BACTERIA\*\***

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH, DE (KERJ)

Inventor: REINSCHEID, DIETER, CA EIKMANN, BERNHARD, DE SAHM, HERMANN, DE

Language: DE (34 pages, 4 drawings)

Application: WO 1995DE1555 A 19951107 (Local application)

Priority: DE 4440118 A 19941111

Designated States: (National Original) CN JP KR US (Regional Original) AT BE CH DE DK ES FR  
GB GR IE IT LU MC NL PT SE

Original IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

Current IPC: C12N-15/31(A) C12N-1/20(B) C12N-1/21(B) C12N-15/11(B) C12P-21/00(B)

Original Abstract: Die Erfindung bezieht sich auf ein DNA-Fragment, das dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltet und von diesem isoliert ist. Diesem DNA-Fragment kann ein beliebiges, für ein Protein kodierendes Strukturgen nachgeschaltet werden. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgen reguliert. Des Weiteren bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Synthese eines beliebigen Proteins durch Kultivierung eines transformierten coryneformen Bakteriums. Ein solches Bakterium enthält in replizierbarer Form ein vom Malatsynthasegen eines coryneformen Bakteriums isoliertes DNA-Fragment, dem das für das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturgen nachgeschaltet ist. Da die Expression des für das zu synthetisierende Protein kodierenden Strukturgen durch das vorgeschaltete DNA-Fragment reguliert ist, wird das Strukturgen exprimiert und das gewünschte Protein synthetisiert, sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird. The invention concerns a DNA fragment located in front of the malate synthase gene of a coryne-form bacterium and isolated from the latter. Any structural gene which codes for a protein can be inserted after this DNA fragment. After transformation of such a construct into a coryne-form bacterium, expression of the structural gene inserted after the DNA fragment is regulated. The invention also concerns a process for synthesizing any protein by culturing a transformed coryne-form bacterium. A bacterium of this type contains in replicable form a DNA fragment isolated from the malate synthase gene of a coryne-form bacterium, and after which the structural gene which codes for the protein to be synthesized is inserted. Since expression of the structural gene which codes for the protein to be synthesized is regulated by the DNA located in front of it, the structural gene is expressed and the desired protein synthesized as soon as a suitable inducing agent is added to the medium.

## South Africa

Publication Number: ZA 199509598 A (Update 199635 E)

Publication Date: 19960731

Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH (KERJ)

Inventor: REINSCHEID D EIKMANNS B SAHM H  
Language: EN (25 pages, 0 drawings)  
Application: ZA 19959598 A 19951113 (Local application)  
Priority: DE 4440118 A 19941111  
Original IPC: C12N-0/00(A) C07K-0/00(B)  
Current IPC: C12N-0/00(A) C07K-0/00(B)

Derwent World Patents Index  
© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.  
Dialog® File Number 351 Accession Number 7392274



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) **Patentschrift**  
(10) **DE 44 40 118 C 1**

(51) Int. Cl. 6:  
**C 12 N 15/77**  
C 12 N 15/31  
C 12 N 1/21  
C 07 K 2/00  
C 07 K 14/34  
// (C12N 15/31, C12R  
1:15) (C12N 1/21,  
C12R 1:15)

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

(23) Patentinhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

(72) Erfinder:

Reinscheid, Dieter, Dr., 59872 Meschede, DE;  
Eikmanns, Berndhard, Dr., 52428 Jülich, DE; Sahm,  
Hermann, Prof., 51428 Jülich, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 05 30 765 A2

(54) Die Genexpression in coryneformen Bakterien regulierende DNA

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein DNA-Fragment, das dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltet und von diesem isoliert ist. Diesem DNA-Fragment kann ein beliebiges, für ein Protein kodierendes Strukturen nachgeschaltet werden. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgens reguliert. Des weiteren bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Synthese eines beliebigen Proteins durch Kultivierung eines transformierten coryneformen Bakteriums. Ein solches Bakterium enthält in replizierbarer Form ein vom Malatsynthasegen eines coryneformen Bakteriums isoliertes DNA-Fragment, dem das für das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturen nachgeschaltet ist. Da die Expression des für das zu synthetisierenden Protein kodierende Strukturen durch das vorgesetzte DNA-Fragment reguliert ist, wird das Strukturen exprimiert und das gewünschte Protein synthetisiert, sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

**DE 44 40 118 C 1**

**DE 44 40 118 C 1**

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine die Genexpression in coryneformen Bakterien regulierende DNA.

Jeder Organismus ist im Laufe des Wachstums darauf angewiesen, Zellsubstanz neu zu synthetisieren. Dabei werden zahlreiche Zellbestandteile, wie z. B. Aminosäuren und Porphyrine, ausgehend von Metaboliten des Citrat-Zyklus neu gebildet. Dies setzt voraus, daß die dem Citrat-Zyklus entzogenen Metabolite neu synthetisiert werden. Bei Wachstum von Mikroorganismen auf Acetat, Ethanol oder Fettsäuren werden Metabolite des Citrat-Zyklus durch eine als Glyoxylat-Zyklus bezeichnete Reaktionsfolge neu synthetisiert (Kornberg, Biochem. J 99 (1966) 1 – 11) Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus sind die Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase. Da die genannten Enzyme in vielen Organismen ausschließlich bei Wachstum auf Acetat, Ethanol bzw. Fettsäuren, nicht jedoch bei Wachstum auf Kohlenhydraten benötigt werden, wird die Aktivität bzw. die Neusynthese der beiden Enzyme häufig durch die Kohlenstoffquelle des Mediums reguliert.

Aufgrund ihrer keulenförmigen Gestalt wird Corynebacterium glutamicum und die mit diesem nah verwandten Arten C. melassecolae, Brevibacterium flavum und B. lactofermentum zu den coryneformen Bakterien gezählt. Weiterhin gehören die genannten Arten zu den "Glutaminsäure-Bakterien", da sie in der Lage sind, unter gewissen Wachstumsbedingungen große Mengen an Glutamat in das Medium auszuscheiden. Die genannten Mikroorganismen sind von großem industriellen Interesse, da sie für die Herstellung von Aminosäuren, Purinen und Proteinen eingesetzt werden können. Für C. glutamicum, C. melassecolae, B. flavum und B. lactofermentum konnte Wachstum auf Acetat bzw. Ethanol bereits nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, daß sie einen Glyoxylat-Zyklus, d. h. auch die Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, besitzen (für einen Überblick siehe: Kinoshita, Amino acids, in Biology of industrial organisms, 1985, pp. 115 – 142, Benjamin/cummings Publishing).

Trotz langjähriger industrieller Anwendung dieser Organismen wurden erst in jüngerer Vergangenheit molekularbiologische Methoden entwickelt, mit deren Hilfe coryneforme Bakterien für angewandte Zwecke gezielt genetisch verändert werden können. In der Regel werden dazu die zu klonierenden Gene unter Kontrolle ihrer eigenen Promotoren auf Vektoren kloniert, die in hoher Kopienzahl in coryneformen Bakterien vorliegen. Dabei zeigte sich in mehreren Fällen, daß eine starke Überexpression einzelner Gene sich nachteilig auf das Wachstum coryneformer Bakterien und somit auf die Produktion gewünschter Produkte auswirkt. Dies hatte seine Ursache darin, daß die Überproduktion eines entsprechenden Genprodukts zu toxischen Effekten innerhalb des Stoffwechsels der Zelle führte und somit das Wachstum dieser Zelle verlangsamt. Beispiele für derartige Fälle ist die homologe Überexpression von mutierten Genen, die für deregulierte Enzyme kodieren, d. h. solche Enzyme, deren Aktivität keiner Endprodukt-Hemmung mehr unterliegt, z. B. die homologe Überexpression des hom1-Gens, das für eine deregulierte Homoserin-Dehydrogenase kodiert. (Reinscheid et al, Appl Environ Microbiol 60 (1994), 126 – 132). Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen die Überexpression eines nichtmutierten Gens im homologen System für das Wachstum von C. glutamicum schädlich ist (z. B. Eikmanns et al, Microbiology 140 (1994) 1817 – 1828). Darüberhinaus kommt es häufig zu Problemen, wenn Gene, die nicht aus coryneformen Bakterien stammen, in diesen überexprimiert werden sollen. Um in coryneformen Bakterien ein gewünschtes Gen zu exprimieren, ohne eine Wachstumshemmung durch das entsprechende Genprodukt in Kauf nehmen zu wollen, existieren verschiedene Möglichkeiten:

Ein gewünschtes Gen kann in einfacher Kopienzahl in das Chromosom von coryneformen Bakterien integriert werden. Da nur eine Kopie dieses Gens in dem Organismus vorliegt, treten in der Regel keine toxischen Effekte durch das entsprechende Genprodukt auf. Eine Schwäche dieses Verfahrens liegt in der arbeitsaufwendigen Methodik, um das gewünschte Ziel zu erreichen. Darüberhinaus wird durch die einfache Kopienzahl des eingefügten Gens nur selten eine ausreichende Menge von einem gewünschten Stoff gebildet.

Eine Alternative zur Integration eines Gens in das Chromosom von coryneformen Bakterien ist die Klonierung eines Gens auf einem Vektor mit niedriger Kopienzahl in coryneformen Bakterien. Dies hat den Vorteil, daß das entsprechende Genprodukt in relativ geringer Menge gebildet wird und damit meistens nicht toxisch für die Zelle ist. Allerdings ist auch in diesem Falle die relativ geringe Menge an gebildetem Genprodukt für biotechnologische Anwendungen ein Nachteil.

Es wäre daher wünschenswert, ein gewünschtes Genprodukt in großer Menge nur zu einem bestimmten Zeitpunkt zu bilden, um nachteilige Effekte dieses Genprodukts auf die Produktion bzw. das Wachstum des Organismus zu umgehen. Um dieses Ziel zu erreichen, bietet es sich an, ein gewünschtes Gen ohne seinen eigenen Promotor hinter einen regulierbaren Promotor zu klonieren. Für die regulierbaren Escherichia coli Promotoren lac, Lambda PL und trp konnte bereits gezeigt werden, daß sie in coryneformen Bakterien zur regulierten Expression verschiedener Gene eingesetzt werden können (Tsuchiya und Morinaga, Bio/Technology 6 (1988) 428 – 431). Allerdings besitzen diese Promotoren verschiedene Nachteile: Zum einen stammen die genannten Promotoren nicht aus coryneformen Organismen und stellen somit Fremd-DNA dar. Durch Einschleusung eines derartigen Promotors in coryneforme Bakterien werden diese zu rekombinanten Organismen, für welche strengere Sicherheitsbestimmungen gelten. Zum anderen sind die Bedingungen, die jeder der drei Promotoren zur Induktion eines Gens benötigt, für industrielle Zwecke relativ un interessant. So benötigt der lac-Promotor zur Induktion eines Gens den verhältnismäßig teuren Stoff IPTG, welcher eine großtechnische Anwendung dieses Promotors unrentabel macht. Der Promotor Lambda PL wird durch Hitze aktiviert. Hitze schadet aber nicht nur dem Organismus sondern könnte sich auch auf das gebildete Produkt schädlich auswirken, so daß dieser Promotor von keinerlei industriellem Interesse für coryneforme Bakterien ist. Der trp-Promotor wird durch Tryptophan-Mangel aktiviert. Da coryneforme Bakterien in der Regel nicht unter Tryptophan-Mangel leiden, würde die Verwendung dieses Promotors die Herstellung coryneformer Tryptophan-Mangel-Mutanten voraussetzen. Da die Gewinnung solcher Mutanten relativ aufwendig ist, hat auch der trp-Promotor bislang keinen Einzug in die biotechnologische Nutzung bei coryneformen Bakterien gefunden.

Den Idealfall für einen regulierbaren Promotor stellte ein coryneformer Promotor dar, der durch einen leicht

verfügbaren, preiswerten Stoff reguliert wird. Der bislang einzige beschriebene coryneforme Promotor ist der des Gens für Isocitrat-Lyase (EP-OS 05 30 765). Dieser Promotor führt zur Expression von Genen, solange sich kein Zucker im Medium befindet. Da jedoch in den meisten Fermentationsmedien Zucker als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden, wäre es sinnvoll, einen regulierbaren Promotor zu erhalten, der auch in Anwesenheit von Zuckern mit einem preiswerten Induktor zur Expression eines Gens führt.

Es ist daher Aufgabe der Erforschung, ein DNA-Fragment bereit zu stellen, das unabhängig von der Kohlenstoffquelle des Kulturmediums eine regulierte Expression verschiedener Gene in coryneformen Bakterien ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfundungsgemäß durch ein dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgesetztes und von diesem isoliertes DNA-Fragment gelöst, das die Expression eines beliebigen, für ein Protein kodierenden, dem DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgen nach Einbau in einen Vektor und Transformation in ein coryneformes Bakterium reguliert.

Es konnte ermittelt werden, daß die Expression des Malatsynthase-Gens in coryneformen Bakterien durch die Anwesenheit von Induktoren, wie beispielsweise Lactat, Pyruvat und/oder Acetat induzierbar ist. Diese Induktion insbesondere durch Acetat erfolgt auch dann, wenn sich noch andere Kohlenstoffquellen im Medium befinden. Sogar in Anwesenheit von Zuckern bzw. in Komplexmedium erfolgt eine signifikante Induktion durch Acetat.

Nach Isolierung eines dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgesetzten DNA-Fragments wird diesem ein beliebiges, für ein zu synthetisierendes Protein kodierendes Strukturgen nachgeschaltet, dieses Konstrukt in einen Vektor ligiert und anschließend in ein coryneformes Bakterium transformiert. Während der Kultivierung eines solchen Transformanten wird zu einem beliebigen Zeitpunkt dem Medium ein Induktor, wie Lactat, Pyruvat, vorzugsweise Acetat, zugegeben, worauf das Strukturgen zum gewünschten Zeitpunkt exprimiert und somit das gewünschte Protein synthetisiert wird. Das erfundungsgemäß bereitgestellte DNA-Fragment erlaubt damit die regulierte Expression von verschiedenen Genen in coryneformen Bakterien. Da die isolierte DNA selbst aus einem coryneformen Bakterium stammt, erfolgt die oben beschriebene Regulation innerhalb eines homologen Systems. Der erfundungsgemäße DNA-Bereich bietet daher zum ersten Mal die Möglichkeit, in einem homologen System, durch einen preiswerten Induktor wie Acetat und unabhängig von der Zusammensetzung des Fermentationsmediums Gene in coryneformen Bakterien reguliert zu exprimieren.

Vorzugsweise wird ein dem Malatsynthase-Gen von *Corynebacterium glutamicum* vorgesetztes und von diesem isoliertes DNA-Fragment bereitgestellt; d. h. aus *C. glutamicum* wurde das Gen für Malatsynthase (*aceB*) zusammen mit den für die Expression und Regulation benötigten Strukturen isoliert und sequenziert. Die DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Tab. 2 dargestellt. In der Tab. 2 ist die Ribosomenbindungsstelle des *aceB*-Gens unterstrichen und mit "RBS" gekennzeichnet. Der potentielle Terminator der Transkription von *aceB* ist durch antiparallele Pfeile dargestellt.

Es konnte festgestellt werden, daß der vor dem Malatsynthase-Gen befindliche DNA-Bereich von Nucleotid 1 bis 574 gemäß Tab. 2 zur regulierten Expression auch anderer Gene führt.

#### Ausführungsbeispiel

##### 1. Untersuchungen zur Aktivität der Malatsynthase in Zellextrakten von *corynebacterium glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien

In Extracten des *C. glutamicum*-Stammes ATCC 13032 (Wildtyp) wurde die Aktivität der Malatsynthase (MSY) nach Wachstum auf verschiedenen Medien bestimmt, um den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Aktivität dieses Enzyms zu untersuchen. Es wurden dazu die Zellen für 14 h in 10 ml 2 × TY-Vollmedium (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) bei 30°C unter Schütteln (120 UpM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, einmal mit Puffer pH 6,8 (0,1 M Kaliumphosphat) gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Mit der erhaltenen Zellsuspension wurde anschließend jeweils 60 ml Medium beimpft um eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,0 zu erhalten. Bei den verwendeten Medien handelte es sich um 2 × TY-Vollmedium oder es wurde CgC-Minimalmedium (Eikmanns et al., Appl Microbiol Biotechnol 34 (1991) 617–622) mit jeweils 1% an Glukose, Acetat, Pyruvat, Laktat, Citrat, Succinat, Fumarat bzw. Glutamat als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Kulturen wurden erneut bei 30°C inkubiert und die  $OD_{600}$  wurde verfolgt. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 8–10 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Puffer pH 7,6 (50 mM Tris/HCl) gewaschen, in 1 ml des gleichen Puffers aufgenommen, und durch Ultraschallbehandlung in einem Branson-Sonifier W250 (10 Minuten, gepulst mit einem Intervall von 20% und einer Leistung von 30 Watt) desintegriert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Homogenat für 30 Minuten bei 13 000 UpM in einer Sigma 2K15 Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, und anschließend der klare Überstand (Rohextrakt) zur Bestimmung der MSY-Aktivität verwendet.

Der Enzymtest enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml, 50 mM Tris/HCl, (pH 7,6), 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Na-Glyoxylat, 0,15 mM Acetyl-CoenzymA und Rohextrakt. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde die Extinktionsabnahme bei 232 nm bestimmt, die sich aufgrund der Spaltung der Thioesterbindung von Acetyl-CoA ergibt. Der Extinktionskoeffizient von Acetyl-CoA bei 232 nm liegt bei 4,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Stadtman, Methods in Enzymology, Vol. 3, 1957, New York: Academic Press). Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit Hilfe der Biuret-Methode (Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248–254) bestimmt. Die erhaltenen spezifischen Malatsynthase-Aktivitäten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, liegt die Aktivität der MSY bei Wachstum auf 2 × TY-Vollmedium sowie auf CgC-Minimalmedium mit Glucose, Citrat, Succinat, Fumarat bzw. Glutamat als Kohlenstoffquelle bei ungefähr

5 0,04 U/mg Protein. Auf CgC-Minimalmedium mit Lactat bzw. Pyruvat als Kohlenstoffquellen steigt die MSY-Aktivität auf Werte von 0,173 U/mg Protein bzw. 0,192 U/mg Protein an. Die höchste MSY-Aktivität wird mit 2,212 U/mg Protein bei Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit Acetat beobachtet. Wurde Acetat den oben genannten Medien zugesetzt, so führte dies ebenfalls zu einem starken MSY-Aktivitätsanstieg auf Werte von 0,500 U/mg Protein bis 1,330 U/mg Protein. Diese Ergebnisse zeigen, daß in *C. glutamicum* die Aktivität der MSY durch die Kohlenstoffquelle des Mediums reguliert wird.

## 2. Isolierung und Subklonierung des MSY-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

10 Zur Isolierung des MSY-Gens (*aceB*) aus *C. glutamicum* wurde basierend auf dem Cosmid pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11 (1980) 291–298) eine corynebakterielle Cosmid-Genbank nach bekannter Methodik (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) angelegt. Dazu wurde aus *C. glutamicum* chromosomal DNA isoliert (Eikmanns et al, Microbiology 140 (1994) 1817–1828) und mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut. Nach Ligation der erhaltenen Fragmente in die BamHI-Schnittstelle des Cosmids pHC79 wurde der Ansatz in die Proteinhülle des Bakteriophagen Lambda verpackt und der *E. coli*-Stamm ED8654 (Murray et al Mol Gen Genet 150 (1977) 53–61) damit transfiziert. Die Verpackung der rekombinanten Cosmide in die Proteinhülle des Phagen Lambda erfolgte nach einer Methode von Sternberg et al. (Gene 1 (1979) 255–280), die Transfektion von *E. coli* ED8654 nach einer Methode von Sambrook et al (Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

15 Aus insgesamt 30 der erhaltenen rekombinanten *E. coli*-Klone wurden die entsprechenden Cosmide isoliert (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) und einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym HindIII unterzogen. Es zeigte sich, daß 24 der untersuchten Cosmide Inserts besaßen, und daß die Inserts Größen von ungefähr 35 kb aufwiesen. Insgesamt 2200 Cosmidtragende *E. coli*-Klone wurden vereinigt und aus diesem Gemisch nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) die Cosmid-DNA präpariert.

20 Zur Isolierung des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* wurde die Cosmid-Genbank in die MSY-defekte *E. coli*-Mutante DV21AO5 (Vanderwinkel und De Vlieghere Eur J Biochem 5 (1968) 81–90) nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert. Die Mutante DV21AO5 ist aufgrund ihres MSY-Defektes nicht mehr in der Lage, auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Nach Transformation der Cosmid-Genbank in diese Mutante wurden insgesamt 1000 Klone erhalten. Von diesen zeigten auf M9-Minimalmedium (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle insgesamt drei Klone Wachstum. Nach Isolierung der entsprechenden Cosmide (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus diesen Klonen und erneuter Transformation in die *E. coli*-Mutante DV21AO5 waren die resultierenden Klone erneut in der Lage, auf M9-Medium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies läßt vermuten, daß auf den drei Cosmiden das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* lokalisiert ist.

25 Um das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* auf einem kleineren Fragment einzugrenzen, wurden die drei Cosmide mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut und nach bekannter Methode (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) auf einem 0,8%-igen Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Fragmente im Größenbereich von 3,0 kb bis 6,0 kb wurden durch Elektroelution (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus dem Gel isoliert und in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pHCYC184 (Chang und Cohen, J Bacteriol (1978) 1141–1156) ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurde *E. coli* DV21AO5 transformiert und die erhaltenen Transformanten wurden erneut auf ihre Fähigkeit untersucht, auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es konnten auf diese Weise neun Klone isoliert werden, deren Plasmide der Mutante DV21AO5 Wachstum auf Acetat erlaubten. Aus den jeweiligen rekombinanten Stämmen wurden die entsprechenden Plasmide isoliert und einer Restriktionskartierung unterzogen. Die Restriktionskarte von einem der Plasmide, pAB-17, ist in Fig. 1 dargestellt. Aus diesem Plasmid wurde nach bekanntem Verfahren das für die MSY kodierende DNS-Fragment durch BfrI-PvuI-Restriktion als 3 kb Fragment isoliert und in den *C. glutamicum*/*E. coli*-Pendelvektor pEK0 (Eikmanns et al, Gene 102 (1991) 93–98) ligiert. In Abhängigkeit von der Orientierung des Inserts im Vektor wurden die neu konstruierten Plasmide als pEKB1a und pEKB1b bezeichnet. Die Restriktionskarten beider Plasmide sind in Fig. 2 präsentiert.

## 55 3. Analyse der Nukleotidsequenz des MSY-Strukturgens und angrenzender Bereiche

60 Für die Sequenzierung wurden zwei sich überlappende Teilstücke, ein 1,6 kb BfrI-KpnI und ein 1,8 kb SphI-PvuI-Fragment, aus dem Plasmid pAB-17 nach bekannter Methode isoliert. Die überhängenden Enden beider Fragmente wurden mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt (Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) und in geeignete Schnittstellen des Plasmids pUC18 (Vieira und Messing, Gene 19 (1982) 259–268) ligiert. Die so erzeugten Plasmide wurden benutzt, um nach der Methode von Henikoff (Gene 28 (1984) 351–359) Deletionskonstrukte zu erzeugen, die anschließend durch die Kettenabbruch-Sequenziermethode (Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463–5467) sequenziert wurden. Die dabei erhältene, gesamte Sequenz des 3 kb BfrI-PvuI-Fragments ist in Tabelle 2 dargestellt. Außerdem ist in Tabelle 2 die von dem *aceB*-Gen abgeleitete Proteinsequenz für die MSY aus *C. glutamicum*, die vor dem Gen befindliche Ribosomenbindungsstelle und die hinter dem Gen liegende Terminationsstruktur für die Transkription abgebildet.

4. NSY-Aktivität von *C. glutamicum*-Stämmen, die das MSY-Gen auf Plasmid tragen

Durch Elektroporation (Liebl et al, FEMS Microbiol Lett 65 (1989) 299–304) wurden die Plasmide pEKB1a und pEKB1b in *C. glutamicum* eingeführt und die resultierenden Stämme als WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) bezeichnet. Nach bekannter Methode wurden die neu konstruierten *C. glutamicum*-Stämme auf CgC-Minimalmedium mit Glukose, Glukose/Acetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 8–10 gezüchtet, Rohextrakte hergestellt und in diesen die spezifische MSY-Aktivität bestimmt. Die gemessenen MSY-Aktivitäten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die *C. glutamicum*-Stämme WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) zeigen auf allen drei Kohlenstoffquellen jeweils signifikant höhere Aktivitäten als der *C. glutamicum*-Wildtyp (WT) und der *C. glutamicum*-Stamm WT(pEK0), der den Ausgangsvektor pEKO enthält. Dieses Ergebnis beweist, daß auf dem 3 kb Bfrl-PvuI-Fragment das aceB-Gen aus *C. glutamicum* funktionell vorliegt. Nach Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) auf CgC-Glukose/Acetat sind deren MSY-Aktivitäten ungefähr achtfach höher als bei Wachstum dieser Stämme auf Glukose. Bei Wachstum der beiden Stämme auf CgC-Minimalmedium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle ist die MSY-Aktivität sogar 16- bis 18-fach höher als bei Wachstum auf CgC-Glukose. Diese Ergebnisse belegen, daß sich auf dem isolierten Fragment alle zur Expression und Regulation des aceB-Gens benötigten Strukturen, d. h. der Promotor und regulatorische Sequenzen, befinden. Diese Strukturen liegen vor dem aceB-Gen. Da das klonierte Fragment vor dem eigentlichen aceB-Strukturen noch 584 bp trägt (siehe Tabelle 2), müssen die Strukturen für Expression und Regulation in diesem DNS-Bereich lokalisiert sein.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65  
5. Untersuchungen zur Regulation und Expression des aceB-Gens aus *C. glutamicum*

Um zu beweisen, daß es sich bei der beobachteten Regulation der MSY um Regulation auf genetischer Ebene und nicht um eine Regulation des Enzyms selbst (z. B. durch Inhibition, Aktivierung oder kovalente Modifikation) handelt, wurden Rohextrakte von auf CgC-Minimalmedium mit Glukose gezüchteten *C. glutamicum* WT bzw. WT(pEKB1a)-Zellen und von auf CgC-Minimalmedium mit Acetat gezüchteten *C. glutamicum* WT(pEKB1a)-Zellen auf ihr Proteinmuster untersucht. Dazu wurden die genannten Stämme nach bekannter Methode auf den entsprechenden Medien gezüchtet, Rohextrakte hergestellt und diese nach der Methode von Laemmli (Nature 227 (1970) 680–685) unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12,5%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Fig. 3). Zur Lokalisation der MSY-Proteinbande im Rohextrakt wurde die MSY aus *C. glutamicum* bis zur Homogenität gereinigt (siehe Anhang 1) und parallel zu den Rohextrakten einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen unterworfen (Fig. 3). Nach Wachstum von *C. glutamicum* WT auf CgC-Acetat erkennt man auf der Höhe der MSY eine deutlich intensivere Proteinbande als nach Wachstum dieses Stammes auf CgC-Glukose. Der Stamm WT(pEKB1a) zeigt nach Wachstum auf CgC-Acetat eine sehr intensive MSY-Proteinbande. Aus der Intensität dieser Bande kann man abschätzen, daß die MSY in diesem Stamm circa 20% des Gesamtzellproteins ausmacht. Das Ergebnis zeigt, daß die für die Expression und Regulation von aceB notwendigen Strukturen, unter induzierten Bedingungen die Neusynthese großer Mengen an Protein herbeiführen. Außerdem wird durch das Ergebnis deutlich, daß die beobachtete Steigerung der MSY-Aktivität nach Wachstum auf Acetat auf die Neusynthese des MSY-Proteins zurückzuführen ist.

## 6. Test des vor dem aceB-Gen liegenden DNS-Bereiches auf Funktionalität in einem unabhängigen System

Der DNS-Bereich vor dem aceB-Gen wurde nach bekannten Methoden als 574 bp Bfrl-Dral-Fragment isoliert, die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und in die mit Klenow-Polymerase aufgefüllte Sall-Schnittstelle des Vektors pEKplCm (Eikmanns et al, Gene 102 (1991) 93–98) ligiert. Dieses Plasmid trägt hinter der Insertionsstelle das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (cat), jedoch ohne eigenen Promotor, d. h. vom Plasmid pEKplCm kann das cat-Gen in *C. glutamicum* nicht abgelesen werden. Nach der Ligation des Bfrl-Dral-Fragments in den Vektor pEKplCm wurde durch Sequenzierung nach bekannter Methode sichergestellt, daß die Orientierung des Bfrl-Dral-Fragments vor dem cat-Gen derjenigen vor dem aceB-Gen entspricht. Das entsprechende Plasmid wurde als pIWI bezeichnet. Nach Einbringen des Plasmids pIWI in *C. glutamicum* nach bekannter Methode wurde in diesem Stamm die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) nach Wachstum auf CgC-Glukose, CgC-Glukose/Acetat bzw. CgC-Acetat bestimmt. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme nach bekannter Methode auf oben genannten Medien bis zu einer OD<sub>600</sub> 8 bis 10 kultiviert, Rohextrakte hergestellt und in diesen die spezifische CAT-Aktivität nach der Methode von Shaw (Meth Enzymol 43 (1975) 737–755) bestimmt. Der Test enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 1 mM Acetyl-CoenzymA, 1 mM 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoësäure) und Rohextrakt und wurde mit 2,5 mM Chloramphenicol gestartet. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde die Extinktionszunahme bei 412 nm bestimmt. Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit Hilfe der Biuret-Methode (Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248–254) bestimmt. Die erhaltenen spezifischen CAT-Aktivitäten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Während in dem *C. glutamicum* WT unter keiner der getesteten Bedingungen CAT-Aktivität nachzuweisen war, zeigte der rekombinante Stamm *C. glutamicum* WT(pIWI) bei allen Kohlenstoffquellen CAT-Aktivität. Allerdings war die CAT-Aktivität nach Wachstum auf CgC-Glukose etwa 20-fach niedriger als nach Wachstum auf CgC-Glukose/Acetat und sogar 50-fach geringer als nach Wachstum auf CgC-Acetat. Dieses Ergebnis belegt, daß das isolierte 574 bp Bfrl-Dral-Fragment die regulierte Genexpression von Fremdgenen erlaubt. Eine Induktion des Fremdgens erfolgt durch Acetat, selbst in Anwesenheit von Zucker.

## Anhang 1

Reinigung von MSY aus *C. glutamicum*

5 Zur Reinigung von MSY aus *C. glutamicum* wurden 60 ml einer in CgC-Acetat-Medium wachsenden Kultur bei OD<sub>600</sub> 8 bis 10 verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit 20 ml 50 mM Morpholinoethansulfonsäure (MES)/NaOH pH 6,0 gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers nach Zugabe von 5 U/ml DNase, 15 µg/mg RNase und 100 µM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid resuspendiert. Aufschluß und Entfernung von Zelltrümmern erfolgte nach bereits bekannter Methode. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Zellextrakt wurde mit 50 mM MES/NaOH pH 6 auf 10 ml verdünnt. Nach 2 h Ultrazentrifugation bei 183 000 × g wurde der Überstand auf einer FPLC-Anlage mit einer HR5/5 MonoQ-Anionenaustauschersäule (Pharmacia LKB, Freiburg Deutschland) chromatographiert. Während der ersten chromatographischen Aufreinigung wurde die MSY mit einem 0,1 M bis 0,4 M NaCl-Gradienten in 50 mM MES/NaOH pH 6 eluiert. Für die zweite Chromatographie wurde der Puffer der partiell gereinigten MSY mittels Ultrafiltration von 50 mM MES/NaOH pH 6 zu 50 mM Tris/HCl pH 8 gewechselt. Während der zweiten chromatographischen Aufreinigung wurde die MSY mit einem 0,2 M bis 0,5 M NaCl-Gradienten in 50 mM Tris/HCl pH 8 eluiert. Während beider chromatographischen Auftrennungen wurde eine Flußrate von 1 ml/min eingestellt. Der Durchfluß beider Auftrennungen wurde in jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt und auf MSY-Aktivität getestet. Die Aktivität enthaltenen Fraktionen wurden jeweils vereinigt.

20

Tabelle 1

Aktivität der Malat-Synthase (MSY) in Rohextrakten von *corynebacterium glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

25

Medium	spezifische MSY-Aktivität (U/mg Protein)
2 × TY-Vollmedium	0,030
2 × TY-Vollmedium + 1% Acetat	0,840
CgC-Minimalmedium (MM) + 1% Glucose	0,040
CgC-MM + 1% Acetat	2,212
CgC-MM + 1% Pyruvat	0,192
CgC-MM + 1% Lactat	0,173
CgC-MM + 1% Citrat	0,038
CgC-MM + 1% Succinat	0,045
CgC-MM + 1% Fumarat	0,034
CgC-MM + 1% Glutamat	0,041
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Glucose	0,970
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Pyruvat	0,730
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Lactat	0,860
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Citrat	0,500
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Succinat	0,920
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Fumarat	0,910
CgC-MM + 1% Acetat + 1% Glutamat	1,330

50

55

60

65

Tabelle 2

1	CTTAAGTGCTGATTCGAATGGCCGGTGCACCAAAAGTATGAGCTAATGCACTGTCACTGTTCGACGTATGTGCATCGGTTTCG	5
91	TGGTGGCGTGGTTCACACATTGCTCCATCGGCATTGGTGCCTCAATCGTTGGGTTTTAAGTTTGTGCAGGGGGGGTGGTCACCCCTGT	
181	TGTGAAGTTTCAAAGTTCTGCCCTTCCGAGAAAAGTGGCGGGGGAGTTGCTACTACGGATGTACTGGCAAATGCTCTGAAATGGAA	
271	AATGCAGGCACCGCAACGTTCCGTAGGTTCAAGGTGTCACCTAGATAAAAGTGGGGTTAGGCGGGGTAATGACTTAGTAAAGTTCG	10
361	CAAACCCCTTTGCTGGTACCGGTGATCACTTAGTCTGATCACATGCCAACACGATAAGGGTTAAAATCGAAAGAAGAGTGGCACCTA	
451	GATTCCAGAGGTAGTCAGAGTGTCTTCTTAAAGAGTTTACAACCGTTAACCGTAGCCAACAAGAAGGATTGCATTCTCTGGT	
541	TTAGGCACAGGTATCTAAACCATGCTTAAAGAGCTTCAATGACTGAACAGGAACGTGTTGCTGCTCAGACTGCCGACAACGCT	15
	RBS H T E Q E L L S A Q T A D N A	
631	GGAACTGACAGCACCGAACCGCGTTGACGCCGGCGGAATGCAGGTGCAAAAGTTCTACGACTTTGTAACCGAACGGTACTCCCTCGC	
	G T D S T E R V D A G G M Q V A K V L Y D F V T E A V L P R	20
721	GTGGGTGGATCGGAAAAGTTCTGGTCCGGATTGCCGCCATGCCGGGACCTCACCCCAACGCAACCGCGAGCTGCTTGCTGCCGC	
	V G V D A E K F W S G F A A I A R D L T P R N R E L L A R R	
811	GATGAACTGCAGATGCTTATCGACGACTACCACCGAACAACTCCGGCACCATCGACCAAGAGGCGTACGAGGATTCCCTCAAAGAAATC	25
	D E L Q M L I D D Y H R N N S G T I D Q E A Y E D F L K E I	
901	GGATACTYGGTTGAGGAGCCAGAAGCTGCAGAAATCGTACCCAAAACGTCGATCGAAATCTCCAGCACCGCAGGACCTCAGCTGGTT	
	G Y L V E E P E A A E I R T Q N V D T E I S S T A G P Q L V	
991	GTTCCAATTCTGAACCGCACGCTTCGGCTGAAACGCTGCCATGTCGCTGGGTTCCCTACAGATGCGTTGACGGCACCAACCCATC	30
	V P I L N A R F A L N A A A N A R H G S L Y D A L Y G T N A I	
1081	CCAGAAACTGATGGCCGTGAAAAGGGCAAGGAGTACAACCCGGTCCCGCGCCAGAAGGTATCGAGTGGGTCGTGAATTCCCGACAGC	
	P E T D G A E K G K E Y N P V R G Q K V I E H G R E F L D S	
1171	GTGTCCTTCACTGGACGGTGCTTCGATCCGATGTTGAGAAGTACAACATCACCGATGAAAGCTTCGAGCCCACATTGGAGATAGCGTC	35
	V V P L D G A S H A D V E K Y N I T D G K L A A H I G D S V	
1261	TACCGACTGAAAAACCGTGAATECTACCGTGGCTCACCGAACCTCCCTGATCCAGAACAGCAATCTGCTGGAAACCAACGGCTGCAC	
	Y R L K N R E S Y R G F T G N F L O P E A I L L E T N G L H	40
1351	ATCGAGCTGAGATCGATCCGTCCACCCAATCGGCAAGGAGACAAGACTGGTCTCAAAGACATCGTTGGAAATCTGCGATCACCG	
	I E L Q I D P V H P I G K A D K T G L K D I V L E S A I T T	
1441	ATCATGGACTTCGAAGACTCCGTTGAGCTGTTGATGCTGAAGACAAGACCTTAGTTACTCTAACCTGGTCTGGACTCAACACCGCCGAA	45
	I M D F E D S V A A V D A E D K T L G Y S N H F G L N T G E	
1531	CTGAAAGAAGAGATGTCAGAACGGACGATCTTCACCCGTGAGCTCAAACAGGACCGCGTCTACATTGGCCGAAATGGTACCGAGCTG	
	L K E E M S K N G R I F T R E L N K D R V Y I G R N G T E L	
1621	GTTCTGCACGGTCGTTCCCTGCTGTTGCGCAACGTTGGTACCTCATGCAAAACCCATCCATCTGATTGATGGCGAGGAGATCTTC	50
	V L H G R S L L F V R N V G H L M Q N P S I L I D G E E I F	
1711	GAAGGCATCATGGATGTTGCTTGACCAACTGTTGTCGACCATCCAGGAATTGCTCCGACAGAACAGATGCCAATTCCGCAAGGGCTCC	
	E G I M D A V L T T V C A I P G I A P Q N K H R N S R K G S	
1801	ATCTACATGTAAGCCTAAGCAGCACGGCCCTGAAGAAGTCGCGTTACCAACGAGCTTCGGCCGGTGTGAGGATCTGCTGATCTG	55
	I Y I V K P K Q H G P E E V A F T H E L F G R V E D L L D L	
1891	CCACGCCACACCTTGAAGGTTGGTTATGGATGAGGAGCGTCGCACGCTCCGTGAACCTGGATGCCAGCATCATGGAAGTTGCTGACCGC	
	P R H T L K V G V M D E E R R T S V N L D A S I H E V A D R	
1981	TTGGCATTCAACACTGGCTTCTGGACCGCACCGCGATGAAATCCACACCTCCATGGAAGCAGGCCCATGGTGCAGAACGGCTGAT	60
	L A F I N T G F L D R T G D E I H T S M E A G A M V R K A D	
2071	ATGCAGACCGCACCGTGAAGCAGGCCATGAGAACAAACAGCTGATGCGAGGTATTGAGCTGGTCTCTGGCAAGGCTCAGATCGGT	
	M Q T A P H K Q A Y E N N N V D A G I Q R G L P G K A Q I G	65
2161	AAGGGCATGTGGCGATGACTGAACATGGCAGAAATGCTGGAGAAGAAGATGGCCAGCCACCGAAGGGCCAACACTGCATGGTT	
	K G M H A M T E L H A E M L E K K I G Q P R E G A N T A H V	

# DE 44 40 118 C1

2251 CCTTCACCAACTGGTGCAGCGCTGCACGCAACGCACTACCACTTGGTTGATGTGTTCAAGGTTCAAGACGAACGTGCTGCCGGCCGC  
 P S P T G A T L H A T H Y H L V D V F K V Q D E L R A A G R  
 5 2341 CGCGACAGCCTGCGCAACATTCTCACCATTCACCAACCGCACAAACCCAATTGGTCTGAGGAAGAGAAGGAAGAGATGGACAAACAC  
 R D S L R N I L T I P T A P N T N H S E E E K K E E M D N N  
 2431 TGCCAGTCATCCTCGGATACGTTGCGCTGGTTGAGCACCGTGTGGTCTCCAAAGGTTCCAGACATCCATGACATCGACCTCATG  
 C Q S I L G Y V V R H V E H G V G C S K V P D I H O I D L H  
 10 2521 GAAGACCGCGCAACGCTGGTATTCCTCGCAGATGCTGGCCAACGGATCCGCATGATGTTGTCGAAGGAGCAGGCTTGGAGTCA  
 E D R A T L R I S S Q M L A N H I R H D V V S K E Q V L E S  
 2611 CTGGAACGAATGGCAGTGCTCGTCGACAACGAAATGGGGCGACGGGCTACCGCATAATGGGCCGAACTACGACGCCCTCCCTGCC  
 L E R M A V V V D K Q N A G D E A Y R D M A P H Y D A S L A  
 15 2701 TTCCAGGGCGCTAAGGACTTGATTTCGAAGGCACCAAGTCCCCATCGGGCTACACCGAGCCATCTTGACCGACGCCGCGAGTTC  
 F Q A A K D L I F E G T K S P S G Y T E P . I L H A R R R E F  
 2791 AAAGCAAAAAACTAACGACGCTTTCGACCGTTACCTGCATCCAAACGGTGAUTGACTGCCCGGAGCCACCCACTCCCTTTGGTCA  
 K A K N -  
 20 2881 GCACCCAAAAGCGCCGGTTCAACACACACAAAGTCGCCATTACCTTCGCCAATATCGGCCACGGTGGAGGCGCGACTTTGCCCTGGA  
 25 2971 TTCCACACCAAGTGGAAATCATGACCATGCCCTCAATGGTGAATGCCATCG  


Tabelle 3

30 Spezifische Aktivität der Malatsynthase (MSY) in Rohextrakten des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und der  
 rekombinanten *c. glutamicum*-Stämme mit den Plasmiden pEK0, pEKB1a und pEKB1b nach Wachstum auf  
 CgC-Minimalmedium mit Glukose, Glukose/Acetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquelle

35	<i>C. glutamicum</i> -	spezifische MSY-Aktivität (U/mg Protein)		
	Stamm	CgC-Glukose	CgC-Glukose/Acetat	CgC-Acetat
40	WT	0,040	0,970	2,11
	WT(pEK0)	0,038	0,954	2,23
45	WT(pEKB1a)	0,350	3,120	6,22
	WT(pEKB1b)	0,374	3,240	6,08
50				

55

60

65

Tabelle 4

Spezifische Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) in Rohextrakten des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und des rekombinanten *C. glutamicum*-Stammes WT(pIWI) nach Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit Glukose, Glukose/Aacetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquelle

5

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	spezifische CgC-Glukose	CAT-Aktivität (U/mg Protein) CgC-Glukose/Aacetat	CgC-Aacetat
WT	0,001	0,001	0,001
WT(pIWI)	0,026	0,620	1,320

10

15

20

## Patentansprüche

1. Ein dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltetes und von diesem isoliertes DNA-Fragment, das die Expression eines beliebigen, für ein Protein kodierenden, dem DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgens nach Einbau in einen Vektor und Transformation in ein coryneformes Bakterium reguliert.
2. DNA-Fragment nach Anspruch 1, vom Malatsynthase-Gen von Corynebakterium glutamicum stammend.
3. DNA-Fragment nach Anspruch 2, mit der Nucleotidsequenz von Nucleotid 1 bis 574 gemäß Tabelle 2, wobei Tabelle 2 Bestandteil dieses Anspruches ist.
4. DNA-Fragment nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3, mit einem beliebigen nachgeschalteten Strukturen.
5. Vektor, enthaltend ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Rekombinante, coryneforme Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
7. Rekombinante, coryneforme Zelle nach Anspruch 6, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 5.
8. Verfahren zur Synthese eines beliebigen Proteins durch Kultivierung eines transformierten, coryneformen Bakteriums, enthaltend in replizierbarer Form ein vom Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums isolierten DNA-Fragment, dem das für das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturgen nachgeschaltet ist und das die Expression des für das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturen reguliert, in einem Medium, dem ein Induktor zugegeben wird, worauf das Strukturgen exprimiert und somit das gewünschte Protein synthetisiert wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß dem Kulturmedium als Induktor Lactat, Pyruvat, vorzugsweise Acetat zugegeben wird.

25

30

35

40

45

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

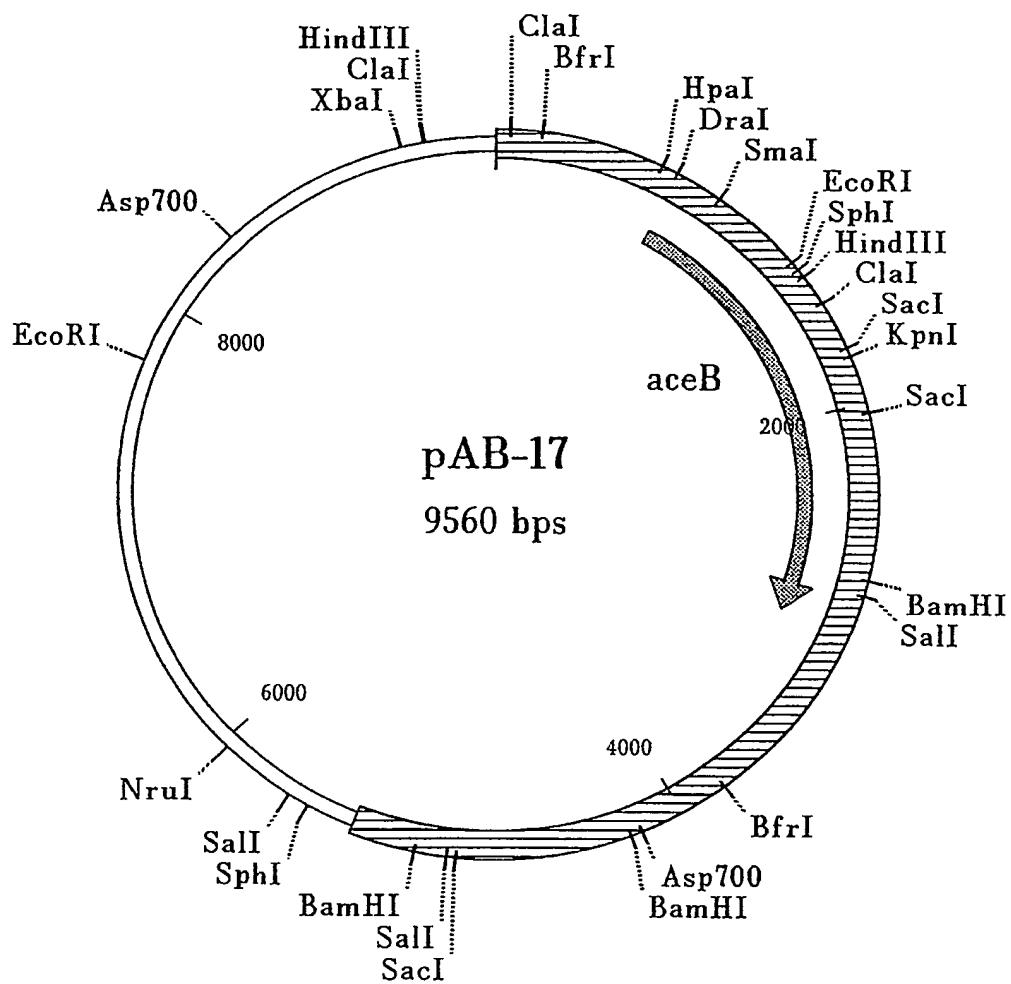
50

55

60

65

Figure 1



Figur 2

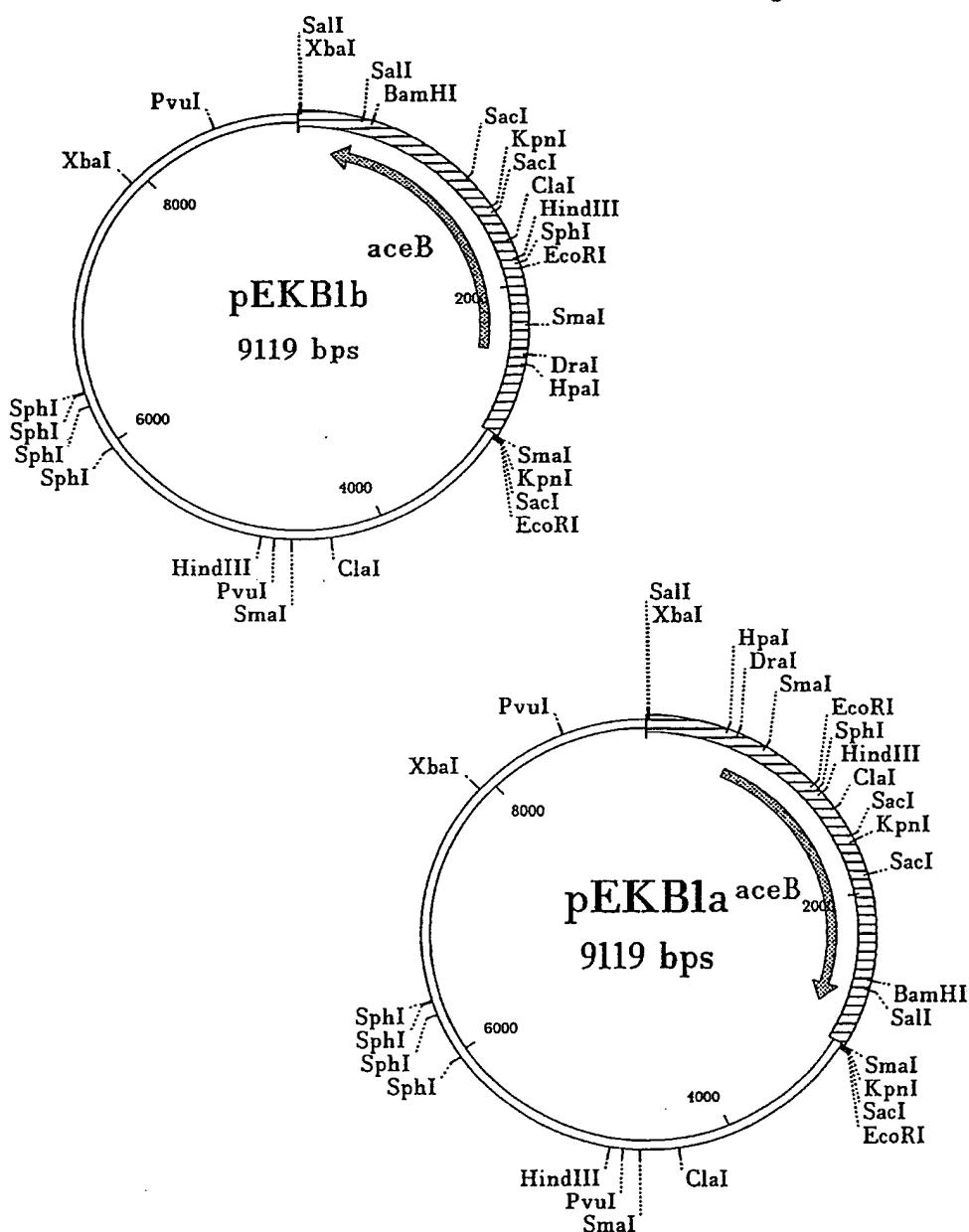


Figure 3

